

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of: Masao WASHIZU, et al.

Serial No.: 09/670,399

Filed: September 27, 2000

For: **METHOD FOR SEPARATING SUBSTANCES USING DIELECTROPHORETIC FORCES**

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119

Director of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

Date: January 9, 2001

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application is hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

JAPANESE APPLICATION NO. 11/279912, Filed September 30, 1999

In support of this claim, the requisite certified copy of said original foreign application is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of a said document. In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 01-2340.

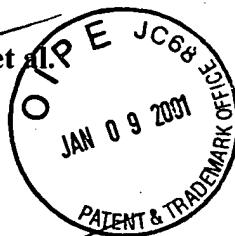
Respectfully submitted,

ARMSTRONG, WESTERMAN, HATTORI,
McLELAND & NAUGHTON, LLP



Donald W. Hanson
Attorney for Applicants
Reg. No. 27,133

Atty. Docket No. 001268
1725 K Street, N.W., Suite 1000
Washington, DC 20006
Tel: (202) 659-2930
Fax: (202) 887-0357
DWH/ll



Group Art Unit: 1743

RECEIVED
JAN 11 2001
TECHNOLOGY CENTER 1700

SAH
#3
1.12.01
Noguera

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 9月30日

出 願 番 号

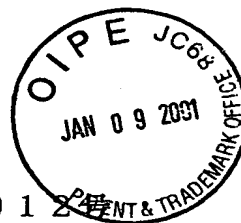
Application Number:

平成11年特許願第279912号

出 願 人

Applicant (s):

和光純薬工業株式会社

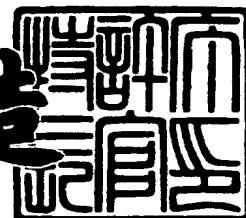


RECEIVED
JAN 11 2001
TECHNOLOGY CENTER 1700

2000年10月13日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3083753

【書類名】 特許願

【整理番号】 H11P025

【提出日】 平成11年 9月30日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市左京区浄土寺上馬場町 1 1 9 セラヴィー 1
 1 9 - 4 0 2

 【氏名】 鷺津 正夫

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県尼崎市高田町 6 番 1 号 和光純薬工業株式会社
 大阪研究所内

 【氏名】 川端 智久

【特許出願人】

 【識別番号】 000252300

 【氏名又は名称】 和光純薬工業株式会社

 【代表者】 田中 幹晃

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 006035

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

 【物件名】 図面 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 誘電泳動力を用いた物質の分離方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 測定対象分子（対象分子 A）を含む試料と、該対象分子 A に特異的に結合し且つ標識物質により標識されていてもよい分子（分子 B）とを反応させて得られる、対象分子 A と分子 B との複合体分子及び遊離の分子 B とが溶解している溶液を、水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極に形成させた、電界強度 500KV/μm 以上の不均一交流電界内に存在せしめ、当該複合体分子と遊離の分子 B とを分離した後、該複合体分子中の分子 B 若しくは該複合体分子中の分子 B に結合した標識物質又は遊離の分子 B 若しくは遊離の分子 B に結合した標識物質に基づいて対象分子 A を測定することを特徴とする、試料中の対象分子 A の測定法。

【請求項 2】 対象分子 A 及び分子 B がヌクレオチド鎖である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 対象分子 A 及び分子 B が蛋白質又はペプチド鎖である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 対象分子 A 及び分子 B のどちらか一方が染色体又はヌクレオチド鎖であって、他方がヌクレオチド鎖である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】 対象分子 A 及び分子 B のどちらか一方が染色体又はヌクレオチド鎖であって、他方が蛋白質又はペプチド鎖である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】 対象分子 A 及び分子 B のどちらか一方がヌクレオチド鎖であって、他方が蛋白質又はペプチド鎖である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】 対象分子 A 及び分子 B のどちらか一方が糖質であって、他方が蛋白質又はペプチド鎖である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】 対象分子 A 及び分子 B のどちらか一方がレクチンであって、他方が糖鎖である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】 対象分子 A を含む試料と、標識物質により標識された対象分子 A（標識対象分子 A）及び分子 B とを反応させて得られる、標識対象分子 A と分子 B との複合体分子（標識複合体分子）、対象分子 A と分子 B との複合体分子

及び遊離の標識対象分子Aとが溶解している溶液を、水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極に形成させた、電界強度500KV/㎠以上の不均一交流電界内に存在せしめ、当該標識複合体分子と、遊離の標識対象分子Aとを分離した後、該標識複合体分子中の標識対象分子Aに結合した標識物質又は遊離の標識対象分子Aに結合した標識物質に基づいて対象分子Aを測定することを特徴とする、試料中の対象分子Aの測定法。

【請求項 1 0】 水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極に、電界強度500KV/㎠以上の不均一交流電界を形成させ、当該不均一交流電界内に 2 種以上の分子が溶解している溶液を存在せしめることを特徴とする、当該分子を相互に分離する方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の利用分野】

本発明は、誘電泳動力を利用した溶液中に溶解した 2 種以上の分子の分離方法に関するものである。

【 0 0 0 2 】

【発明の背景】

近年、半導体技術の進歩によりフォトリソグラフィー等の微細加工技術によってnmから μm 単位での物質加工技術が確立され、現在もその微細加工技術は進歩しつづけている。

【 0 0 0 3 】

化学・生化学分野に於いては、この微細加工技術を利用して、生体試料からの分析対象成分の抽出（抽出工程）、化学・生化学反応を用いる当該成分の分析（分析工程）、並びにそれに続く分離処理（分離工程）及び検出（検出工程）といった一連の化学的・生化学的分析工程の全てを一辺数cm～数十cmのチップ上に集積化等した極小の分析装置をもちいて行う、微細総分析システム [Micro Total Analysis System (μ -TAS)、Laboratory on a chip] と呼ばれる新技術が発展しつつある。

【 0 0 0 4 】

この μ -TASの手法は、化学的・生化学的分析工程全てを通じて、分析時間の短縮化、使用するサンプル量や化学・生化学反応に必要な試薬量の低減化、分析機器や分析スペースの縮小化に大きく貢献するものと期待されている。

【0005】

特に、 μ -TASに於ける分離工程については、テフロンやシリカ等を材料として作製された内径1mm以下のキャピラリー（細管）を分離カラムとして使用して高電界中で物質の持つ電荷の差を利用して分離を行うキャピラリー電気泳動法や、同様のキャピラリーを用いてカラム担体と物質との相互作用の差を利用して分離を行うキャピラリーカラムクロマトグラフィー法が開発されている。

【0006】

しかしながら、キャピラリー電気泳動法は、分離に高電圧が必要であることや、検出領域でのキャピラリー容量が制約されるため検出感度が低いという問題、更には、チップ上のキャピラリーチップでは、分離のためのキャピラリー長に制約があり、高分子の分離に十分なキャピラリー長が得られないため、低分子の物質の分離には適しているが高分子の物質の分離には適さないという問題を有している。また、キャピラリーカラムクロマトグラフィー法は、分離処理の高速化に限界があり、処理時間の短縮化が困難であるという問題を有している。

【0007】

そこで、近年、上記した如き問題を解決する手段の一つとして、物質を不均一な交流電界内に置くと、物質内に正と負の分極が起こり、物質を取り囲む媒質の誘電率が物質よりも大きいと物質は電界の低い方向へ移動し、媒質の誘電率が物質よりも小さいと物質は電界の強い方向へと移動する力が働く現象、いわゆる誘電泳動力 [H.A.Pohl: "Dielectrophoresis", Cambridge Univ. Press (1978)、T.B.Jones: "Electromechanics of Particles", Cambridge Univ. Press (1995) 等] を利用した分離方法が、注目されている。

【0008】

この分離方法は、(1) 誘電泳動力の大きさは、物質（粒子）の大きさ・誘電的性質に依存し、電界傾度に比例するため、微細加工電極を用いれば、電界および電界傾度をきわめて大きくとることができるので、キャピラリー電気泳動のよ

うに高電圧を必要とせず、低い印加電圧で高速な分離が期待できる、(2) 電界の強い場所が微小領域に極限されるため、電界印加による温度上昇も最小限にとどめることができ、また、高電界場の形成が可能となる、(3) 誘電泳動は、電界傾度に比例する力であることからわかるように、印加電圧の極性に依存しないので、交流電界下でも直流同様に力が働く。従って、高周波交流を用いれば水溶液での電極反応(電気分解反応)は生じないので、電極自体をチャンネル(サンプル流路)中に集積化することが可能となる、(4) キャピラリー電気泳動のように検出部分のチャンバ容量に制約がないことから検出感度の向上も望める、等の点から、現在では μ -TASに於ける最も適した分離方法と考えられている。

【0009】

一方、上記した如き誘電泳動力を利用した分離方法として、現在までに種々の方法が報告されている [M. Washizu, et al., IEEE Transaction IA, Vol.30, No.4 p.835-843 (1994)、M. Washizu, et al., Conf. Rec. The Institute of Electrostatics Japan, '93 ann. Meet. (Int'l Session), p27-32 (1993)、Y. Huang, et al., Biophys. J., Vol.73, p.1118-1129 (1997)及びN.G. Green et al., J. Phys. D.: Appl. Phys., Vol31, 25-30 (1998)等]。

【0010】

例えば、ジャーナル オブ フィジックス D, ブリティッシュ ジャーナル オブ アプライド フィジックス (J. Phys. D: Appl. Phys.) 27, 2659-2662(1994)には、HL-60細胞と、正常の血液細胞とを含有する懸濁液から、夫々の細胞を分離し得ることが、マイクロバイオロジー, 140, 585-591(1994)には、各種微生物を含有する懸濁液から、酵母や細菌種の違いにより微生物を分離し得ることが、ジャーナルオブバイオテクノロジー, 32, 29-37(1994)には、酵母の生菌と死菌とを含有する懸濁液から、両者を分離し得ることが、また、J. Phys. D: Appl. Phys., 31, 25-30(1998)には、直径93nmのラテックス粒子と216nmのラテックス粒子とを含有する懸濁液から、両者を誘電泳動力及び電気流体力により分離し得ることが夫々報告されている。

【0011】

また、M. Washizu, et al., IEEE Transaction IA, Vol.30, No.4 p.835-843

(1994)には、単一の生体成分を含む溶液を試料として用い、当該成分が誘電泳動力により電極に捕集されること〔例えばアビジン (68kDa) , コンカナバリン A (52kDa) , キモトリブシノーゲン A (25kDa) 又はリボヌクレアーゼ A (13.7kDa) 〕、並びに単一の生体成分を含む溶液を試料として用い、当該成分を誘電泳動力により捕集し得ること〔48.5kbDNA単独試料を用いた場合の捕集率100%、15 kbDNA単独試料を用いた場合の捕集率約60%、9 kb環状DNA単独試料を用いた場合の捕集率約50%、アビジン (68kDa) 単独試料を用いた場合の捕集率数%〕が報告されている。

【 0 0 1 2 】

しかしながら、上記した如き従来の誘電泳動力を利用した分離方法についての報告は、各種細胞やラテックス粒子といった、DNAやタンパク等に比べて溶液への溶解性が極めて低い粒子の分離、或いは単一 (1種類) のDNAやタンパクの単なる捕集に限られており、2種以上の分子、特に、例えばDNAやタンパク等の生体成分分子が溶解している溶液からの、夫々の分子の分離を行うことの報告は未だなされていない。

【 0 0 1 3 】

これは、誘電泳動力の強さは、物質の持つ物理的な大きさに依存し、大きな体積を持つ物質ほど大きな誘電泳動力を受けるため、細胞やラテックス粒子に比べてその物理的な大きさが非常に小さいタンパクやDNA等の、2種以上の分子が溶解している溶液から、誘電泳動力を利用して夫々の分子の大きさの違いに基づいて、これらを相互に分離することは困難であると考えられていたためである。

【 0 0 1 4 】

【発明が解決すべき課題】

本発明は、上記した如き状況に鑑みなされたもので、溶液中に溶解する2種以上の分子を、誘電泳動力を利用して相互に分離する方法を提供することにある。

【 0 0 1 5 】

【課題を解決するための手段】

本発明は、上記課題を解決する目的でなされたものであり、

(1) 測定対象分子 (対象分子 A) を含む試料と、該対象分子 A に特異的に結合

し且つ標識物質により標識されていてもよい分子（分子B）とを反応させて得られる、対象分子Aと分子Bとの複合体分子及び遊離の分子Bとが溶解している溶液を、水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極に形成させた、電界強度500KV/㎠以上の不均一交流電界内に存在せしめ、当該複合体分子と遊離の分子Bとを分離した後、該複合体分子中の分子B若しくは該複合体分子中の分子Bに結合した標識物質又は遊離の分子B若しくは遊離の分子Bに結合した標識物質に基づいて対象分子Aを測定することを特徴とする、試料中の対象分子Aの測定法、

（2）対象分子Aを含む試料と、標識物質により標識された対象分子A（標識対象分子A）及び分子Bとを反応させて得られる、標識対象分子Aと分子Bとの複合体分子（標識複合体分子）、対象分子Aと分子Bとの複合体分子及び遊離の標識対象分子Aとが溶解している溶液を、水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極に形成させた、電界強度500KV/㎠以上の不均一交流電界内に存在せしめ、当該標識複合体分子と、遊離の標識対象分子Aとを分離した後、該標識複合体分子中の標識対象分子Aに結合した標識物質又は遊離の標識対象分子Aに結合した標識物質に基づいて対象分子Aを測定することを特徴とする、試料中の対象分子Aの測定法、及び

（3）水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極に、電界強度500KV/㎠以上の不均一交流電界を形成させ、当該不均一交流電界内に2種以上の分子が溶解している溶液を存在せしめることを特徴とする、当該分子を相互に分離する方法、に関する発明である。

【0016】

即ち、本発明者らは、誘電泳動力を利用して、2種以上の分子、特に、例えばDNAやタンパク等の、生体成分分子が溶解している溶液から、夫々の分子を相互に分離し得る方法を求めて鋭意研究を重ねた結果、強電界強度、即ち、電界強度500KV/㎠以上の不均一交流電界を形成させ、このなかに2種以上の分子が溶解している溶液を存在せしめると、誘電泳動力により、夫々の分子を相互に分離し得、当該溶液中の目的とする特定の分子を測定し得ること、更には、この現象を利用すれば、当該溶液中の目的とする特定の分子を分取し得ることを見出し、本発

明を完成するに至った。

【0017】

尚、誘電泳動力とは、以下に示す如き現象により生じる力である。

即ち、電界内に置かれた中性分子には、図1に示すように電界の下流側に正極性の分極電荷 $+q$ が、上流側には負極性の分極電荷 $-q$ が夫々誘導され、 $+q$ には電界 E により大きさ $+qE$ の力が働き、この部分を電界の下流側へと引くのに対し、 $-q$ には電界 E により大きさ $-qE$ の力が働き、この部分を電界の上流へと引く。分子が中性ならば、 $+q$ と $-q$ の絶対値は等しく、もし電界が場所によらず一定であるならば、両者に働く力は釣り合っ分子は動かない。しかし、電界が一樣でない場合を図1に示すが、この場合には、強い電界側へ引く力の方が大きくなり、分子は電界の強い側へと駆動されることとなる。このように不均一な電界内で中性粒子が移動する現象を誘電泳動 (Dielectrophoresis, DEP) と呼び、この際に分子に働く力を誘電泳動力と呼ぶ。尚、分子が荷電分子である場合は、該誘電泳動力に加えて、電気泳動力を併せた移動様式となる。

【0018】

本発明に於ける2種以上の分子は、溶液に溶解し得るのものであればよく、例えばヌクレオチド鎖 (オリゴヌクレオチド鎖、ポリヌクレオチド鎖等)、染色体、ペプチド鎖、蛋白質、糖質、糖鎖、レクチン等の生体由来成分が挙げられる。

尚、本発明の方法によれば、上記した如き分子のうち、同種類であって分子量が異なる2種以上の分子であっても、また、全く異なる2種以上の分子であっても分離可能である。同種類であって分子量が異なる2種以上の分子の組み合わせとしては、例えば、ヌクレオチド鎖 (オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド)、染色体から選ばれる分子の組み合わせや、例えばペプチド鎖、蛋白質から選ばれる分子の組み合わせ等が挙げられる。また、全く異なる2種以上の分子の組み合わせとしては、例えば、ヌクレオチド鎖 (オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド)、染色体から選ばれる分子と、ペプチド鎖、蛋白質から選ばれる分子との組み合わせや、糖質と、ペプチド鎖、蛋白質から選ばれる分子との組み合わせ、或いは糖鎖と、ペプチド鎖、蛋白質、レクチンから選ばれる分子との組み合わせ等が挙げられる。

【0019】

上記した如き2種以上の分子が溶解している溶液としては、例えば血清、血漿、髄液、滑液、リンパ液等の体液、又は尿、糞便等の排泄物等の生体由来試料及びその処理物等が挙げられる。また、処理物としては、例えばこれら生体由来試料を水や緩衝液等で適宜希釈等したもの、或いはこれら生体由来試料に由来する上記した如き分子を水や緩衝液等に適宜溶解させ、再構成して得られたもの等が挙げられる。尚、本発明に係る2種以上の分子が溶解している溶液には、化学的に合成された上記した如き分子を含有するものも包含される。

【0020】

本発明に於いて用いられる緩衝液としては、例えばトリス（ヒドロキシメチルアミノメタン）緩衝液、グッドの緩衝液、リン酸塩緩衝液、ホウ酸塩緩衝液等、通常この分野で使用されるものが挙げられる。

【0021】

尚、上記した如き溶液の電導率が高いと、電圧の印加に伴い溶液中に電流が流れることによってジュール熱が発生し、溶液が沸騰する可能性があるので、通常電導率が10mS/cm以下、好ましくは200 μ S/cm以下の範囲となるように適宜調整等して用いるのが好ましい。

【0022】

本発明に於いて、水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極とは、例えばアルミニウム、金等の導電性の材質からなるものであり、その構造は、誘電泳動力、即ち、水平及び垂直方向に不均一電界を生じ得るものであればよく、例えば、インターデジタル形状 [J. Phys. D: Appl. Phys. 258, 81-88, (1992)、Biochim. Biophys. Acta., 964, 221-230, (1988)等] が挙げられる。より具体的には、図2に示すように、三角形、方形、台形、正弦波形、或いは鋸歯形等の形状が好ましく、これらが繰り返し規則的に連続して配置された構造でもよい。尚、特定の分子を分取する目的で使用する場合には、当該繰り返し規則的に連続して配置された構造を有する電極が好ましい。

【0023】

このような電極は、通常、例えばガラス、石英、シリコン等の非導電性の材質

からなる基板上に、自体公知の微細加工技術 [Biochim. Biophys. Acta., 964, 221-230等] を用いて、1対以上の上記した如き形状の電極を櫛歯状に設けることにより作製される。また、隣接（対向）する電極間の距離は、強電界強度の不均一交流電界を形成しえるものであれば特に限定されず、目的の分子の種類により適宜設定すべきものであり一概には言えないが、例えばペプチド鎖、蛋白質等の場合、電極の最大幅同士の距離（最小ギャップ）が、通常 $10\mu\text{m}$ 以下、好ましくは $5\mu\text{m}$ 以下であり、ヌクレオチド鎖（ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド）等の場合、通常 $100\mu\text{m}$ 以下、好ましくは $50\mu\text{m}$ 以下である。また、染色体等の場合、最小ギャップが、通常 $50\mu\text{m}$ 以下、好ましくは $10\mu\text{m}$ 以下である。尚、隣接（対向）する電極間の距離は、目的の分子に対してあまり広すぎると十分な電界強度の不均一交流電界を形成することができず、また、狭すぎると目的の分子を捕集し得なくなる場合があるので注意が必要である。

【0024】

本発明に於いて、上記した如き電極に形成させる不均一交流電界の電界強度としては、溶液中の2種以上の分子の種類により適宜設定すべきものであり一概には言えないが、通常 $500\text{KV}/\text{m}$ 以上、好ましくは $500\text{KV}/\text{m}\sim 10\text{MV}/\text{m}$ 、より好ましくは $500\text{KV}/\text{m}\sim 3.5\text{MV}/\text{m}$ の範囲から適宜選択される。尚、電界強度を強くすると、発熱により分析が困難となる場合があるが、このような可能性がある場合には、電極部分を適宜冷却する等すればよい。

より具体的には、例えば目的とする分子がヌクレオチド鎖（オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド）、染色体等の場合には、 $500\text{KV}/\text{m}$ 以上、好ましくは $500\text{KV}/\text{m}\sim 10\text{MV}/\text{m}$ 、より好ましくは $500\text{KV}/\text{m}\sim 3.5\text{MV}/\text{m}$ であり、また、例えば目的とする分子がペプチド鎖、蛋白質等の場合には、 $1\text{MV}/\text{m}$ 以上、好ましくは $1\text{MV}/\text{m}\sim 10\text{MV}/\text{m}$ 、より好ましくは $1\text{MV}/\text{m}\sim 3.5\text{KV}/\text{m}$ である。

また、当該不均一交流電界の周波数としては、通常 $100\text{Hz}\sim 10\text{MHz}$ 、好ましくは $1\text{KHz}\sim 10\text{MHz}$ である。

【0025】

本発明の分離方法を実施するには、例えば以下の如く行えばよい。

〔方法1〕

上記した如き電極（電極基板）を用いて形成させた不均一交流電界内に、2種以上の分子が溶解している溶液を存在させて、当該分子を相互に分離するには、例えば目的とする対象分子のみが誘電泳動力によって移動するような（例えば特定の分子のみが誘電泳動力により電極の特定部分に移動し、電極の特定部分に捕集されるが、それ以外の分子には十分な誘電泳動力が発生せず、電極の特定部分に捕集されないような）電界強度の不均一交流電界を形成するように条件を適宜設定して不均一電界中に存在する分子の移動様式の違いによって分離してもよいし、また、媒質の誘電率、導電率や印加する電界の周波数を調整して目的とする分子に正の誘電泳動力が、それ以外の分子に負の誘電泳動力が発生するような条件を適宜設定し、電界の強い領域と電界の弱い領域に分子を夫々分離してもよい。

【0026】

〔方法2〕

上記した如き電極（電極基板）を用いて形成させた不均一交流電界内に目的とする分子を移動させ、電界により分子に発生する誘電泳動力と分子の移動との相互作用によって分離を行ってもよい。この場合、より強い誘電泳動力を受ける分子は、弱い誘電泳動力を受ける分子よりも遅延して移動するため、分子の分離がより容易に可能となる。

より具体的には、図3に示すような、前記した如き電極と、当該電極上を2種以上の分子が溶解した溶液が移動できるように設けられた流路とを有する電極基板を用い、当該電極に電圧を印加しつつ、当該印加により形成された電界強度500KV/m以上の不均一交流電界内を2種以上の分子が溶解した溶液を移動させればよい。尚、図3に於いて、矢印は2種以上の分子が溶解した溶液が移動する方向を示す。

即ち、溶液中の分子は、電極上で誘電泳動力により電界のより強い電極近傍へと引き寄せられる。ここで分子の運動は、誘電泳動力 F_d 、流路内の流れによる抗力 F_v 、熱運動による力 F_{th} の3つの要因により支配され、① $F_d \gg F_v + F_{th}$ の場合には、分子は電極に捕集（トラップ）され、② $F_d < F_v + F_{th}$ の場合には、電界に関わらず、分子は流路内の流れにのって流出する。また、③ $F_d \approx$

$F_v + F_{th}$ の場合には、分子は電極に吸着・脱着を繰り返しながら下流へと運ばれる結果、本来の流路内の流れよりも遅れて出口に到達する。従って、上記①の如き条件下で行えば、大きい誘電泳動力を受ける分子は電極の特定部分に捕集され、それ以外の分子は電極の特定部分に捕集されずに流れてくるので、2種以上の分子を相互に分離することが可能となる。また、上記③の如き条件下で行えば、より大きい誘電泳動力を受ける分子は小さい誘電泳動力を受ける分子よりも流路内での移動速度が遅くなるので、2種以上の分子を相互に分離することが可能となる。

尚、上記〔方法2〕に於いて、2種以上の分子が溶解した溶液を移動させるには、例えば送流ポンプ等を用いた物理的な媒質の流れを利用してもよいし、また、電気浸透流を利用してもよい。

【0027】

本発明の分離方法によれば、2種以上の分子が溶解する溶液中から、目的とする特定の分子を分取することができる。

即ち、前記した如き本発明に係る分離方法〔方法1〕に於いては、例えば特定の分子は電極の特定部分に捕集され、それ以外の分子は電極の特定部分に捕集されないように2種以上の分子を分離した後、電界を印加したまま、通常この分野で用いられる適当な緩衝液又は水等を用いて電極を洗浄し、次いで、電界の印加を中止して適当な緩衝液又は水等を用いて電極を洗浄すれば、特定の分子又はそれ以外の分子を夫々分取することができる。

【0028】

また、前記した如き本発明に係る分離方法〔方法2〕に於いては、例えば①の条件下で分離を行った場合には、流路出口に於いて、先ず、電極の特定部分に捕集されずに移動してきた小さい誘電泳動力を受ける分子を含有する移動溶液を分取し、次いで、電界の印加を中止して適当な緩衝液又は水等を用いて電極を洗浄することにより、電荷印加時に電極の特定部分に捕集されていた大きい誘電泳動力を受ける分子を流路出口に移動させて当該分子を含有する洗浄液を分取すれば、特定の分子又はそれ以外の分子を夫々分取することができ、また、③の条件下で分離を行った場合には、流路出口に於いて、先ず、小さい誘電泳動力を受ける

分子を含有する移動溶液を分取し、次いでこれより移動速度が遅いより大きい誘電泳動力を受ける分子を含有する移動溶液を分取すれば、特定の分子又はそれ以外の分子を夫々分取することができる。

【0029】

また、本発明の分離方法により分離された2種以上の分子のうちの一方を、当該分子が有する性質に応じた方法により測定すれば、溶液中の目的とする特定の分子を測定することができる。

【0030】

また、測定対象分子（対象分子A）と該測定対象分子に特異的に結合し且つ標識物質により標識されていてもよい分子（分子B）との相互作用の結果生じる複合体分子と、遊離の分子Bとの分離、いわゆるB/F分離を、本発明の分離方法により行った後、当該複合体分子中の対象分子A又は分子B（又は該複合体分子中の分子Bに結合した標識物質）、或いは遊離の分子B（又は遊離の分子Bに結合した標識物質）を測定することにより、試料中の対象分子Aを迅速且つ容易に測定し得る。

即ち、対象分子Aを含む試料と、分子B〔又は標識物質により標識された分子B（標識分子B）〕とを反応させ、生じた対象分子Aと分子B（又は標識分子B）との複合体分子と、遊離の分子B（又は標識分子B）とを、前述した如き本発明の分離方法により分離する。次いで、分離された該複合体分子を、該複合体分子中の分子B（又は該複合体分子中の分子Bに結合した標識物質）の性質に基づいて検出することにより、試料中の対象分子Aの存在の有無を測定することができる。

【0031】

更に、例えば以下の如き方法によれば、試料中の対象分子Aの存在を測定し得るのみでなく、試料中の対象分子Aの量を定量的に測定し得る。

即ち、対象分子Aを含む試料と、分子B〔又は標識物質により標識された分子B（標識分子B）〕とを反応させ、生じた対象分子Aと分子B（又は標識分子B）との複合体分子と、遊離の分子B（又は遊離の標識分子B）とを、前述した如き本発明の分離方法により分離する。次いで、分離された該複合体分子中の分子

B（又は該複合体分子中の分子Bに結合した標識物質）の量、或いは遊離の分子B（又は遊離の標識分子Bに結合した標識物質）の量を、分子B又は標識物質の性質に応じた測定方法により求め、これらの量に基づいて、試料中の対象分子Aの量を求めることができる。

【 0 0 3 2 】

また、対象分子Aを含む試料、標識物質により標識された対象分子A（標識対象分子A）及び分子Bを反応させ、標識対象分子Aと分子Bとの複合体分子（標識複合体分子）と、対象分子Aと分子Bとの複合体分子を形成させた後、標識複合体分子と、遊離の標識対象分子Aとを、前述した如き本発明の分離方法により分離する。次いで、分離された該標識複合体分子中の標識対象分子Aに結合した標識物質の量又は遊離の標識対象分子Aに結合した標識物質の量を、標識物質の性質に応じた測定方法により求め、これらの量に基づいて、試料中の対象分子Aの量を求めることができる。

【 0 0 3 3 】

尚、これら上記の方法に於いて、得られた分子B又は標識物質の量に基づいて、試料中の対象分子Aの量を求めるには、例えば測定対象分子A濃度既知の試料を用いて同様の方法により測定を行い、得られた対象分子A量と複合体分子中の分子B（又は標識物質）の量或いは遊離の分子B（又は標識分子B中の標識物質）の量との関係を示す検量線や、対象分子A量と標識複合体分子中の標識物質の量（又は遊離の標識対象分子A中の標識物質の量）との関係を示す検量線を、夫々用いて試料中の対象分子Aの量を算出すればよい。

【 0 0 3 4 】

本発明の測定方法に於ける測定対象分子A（対象分子A）としては、前述した如き溶液に溶解し得るのものであって、①該対象分子Aと互いに相互作用を及ぼしあい、複合体分子を形成し得る分子（分子B）が存在し、該分子Bがそれ自身何らかの方法により測定（検出）し得る性質を有しているか、又は標識物質により標識可能なもの、であるか、②該対象分子Aが標識物質により標識可能であって、該対象分子Aと互いに相互作用を及ぼしあい、標識複合体分子を形成し得る分子（分子B）が存在するもの、であればよい。

【0035】

対象分子Aとしては、例えばヌクレオチド鎖（オリゴヌクレオチド鎖、ポリヌクレオチド鎖）、染色体、ペプチド鎖（例えばC-ペプチド、アンジオテンシンI等）、蛋白質（例えば免疫グロブリンA（IgA）、免疫グロブリンE（IgE）、免疫グロブリンG（IgG）、 β_2 -ミクログロブリン、アルブミン、フェリチン等の血清蛋白質、例えばアミラーゼ、アルカリホスファターゼ、 γ -グルタミルトランスファラーゼ等の酵素蛋白、例えばルペラウイルス、ヘルペスウイルス、肝炎ウイルス、ATLウイルス、AIDSウイルス等のウイルスに対する抗ウイルス抗体やこれらウイルスに由来する抗原性物質、例えば各種アレルゲンに対する抗体、例えばリポ蛋白質等の脂質、例えばトリプシン、プラスミン、セリンプロテアーゼ等のプロテアーゼ等）、糖鎖（例えば α -フェトプロテイン、CA19-9、前立腺特異抗原、癌胎児性抗原、癌細胞の産生する特殊な糖鎖を有する物質等が有する糖鎖）、レクチン（例えばコンカナバリンA、レンズマメレクチン、インゲンマメレクチン、ダツラレクチン、小麦胚芽レクチン等）等の生体由来成分が挙げられる。

【0036】

これら対象分子Aに特異的に結合し且つ標識物質により標識されていてもよい分子（分子B）としては、上記した如き対象分子Aと互いに相互作用を及ぼしあい、複合体分子を形成し得る分子であって、要すれば、それ自身が何らかの方法により測定（検出）可能であるか、又は標識物質により標識可能なもの、であればよく、例えば抗原性を有する分子に対する抗体、抗体に対する抗原、特定構造の糖鎖に対して結合する性質を有するレクチン、酵素に対するインヒビター、特定の蛋白質に結合する性質を有するペプチド鎖、染色体や遺伝子の特定の塩基配列に相補的なヌクレオチド鎖等が挙げられる。尚、これら分子Bのうち、それ自身何らかの方法により測定（検出）可能なものとしては、例えば酵素、色素、蛍光性物質、発光性物質又は紫外部に吸収を有する物質等のように、それ自身が標識物質としての性質を有しているものが挙げられる。

【0037】

本発明に於いて用いられる標識物質としては、酵素免疫測定法（EIA）、放射

免疫測定法 (RIA)、蛍光免疫測定法 (FIA)、ハイブリダイゼーション法等、通常この分野で用いられるものであればよく、例えばアルカリホスファターゼ (ALP)、 β -ガラクトシダーゼ (β -Gal)、パーオキシダーゼ (POD)、マイクロパーオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ (GOD)、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH)、リンゴ酸脱水素酵素、ルシフェラーゼ等の酵素類、例えばクーマシーブリリアントブルー-R250、メチルオレンジ等の色素、例えば ^{99m}Tc 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、等の放射性同位元素、例えばフルオレセイン、ローダミン、ダンシル、フルオレスカミン、クマリン、ナフチルアミン或はこれらの誘導体、ユウロピウム (Eu) 等の蛍光性物質、例えばルシフェリン、イソルミノール、ルミノール、ビス(2,4,6-トリフロロフェニル)オキサレート等の発光性物質、例えばフェノール、ナフトール、アントラセン或はこれらの誘導体等の紫外部に吸収を有する物質、例えば4-アミノ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル、3-アミノ-2,2,5,5-テトラメチルピロリジン-1-オキシル、2,6-ジ-*t*-ブチル- α -(3,5-ジ-*t*-ブチル-4-オキシ-2,5-シクロヘキサジエン-1-イリデン)-*p*-トリルオキシル等のオキシル基を有する化合物に代表されるスピンラベル化剤としての性質を有する物質等が挙げられる。

【0038】

標識物質により、対象分子A又は分子Bを標識するには、通常この分野で用いられる常法、例えば自体公知のEIA、RIA、FIA或いはハイブリダイゼーション法等に於いて一般的に行われている自体公知の標識方法〔例えば、医化学実験講座、第8巻、山村雄一監修、第1版、中山書店、1971；図説 蛍光抗体、川生明著、第1版、(株)ソフトサイエンス社、1983；酵素免疫測定法、石川栄治、河合忠、宮井潔編、第3版、医学書院、1987、モレキュラー クローニング ア ラボラトリー マニュアル セカンド エディション、J. サムブルック、E. F. フリッシュ、T. マニアティス、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー プレス等〕や、アビジン (又はストレプトアビジン) とビオチンの反応を利用した常法等何れの方法により行ってもよい。

【0039】

本発明の測定方法に於いて、対象分子Aと分子B (又は標識分子B) とを反応

させて、複合体分子を形成する際の反応条件、或いは、対象分子A、標識対象分子A)及び分子Bを反応させて、標識複合体分子を形成させる際の反応条件としては、当該複合体分子(又は標識複合体分子)が形成されるのを妨げるような条件でなければよく、常法、例えば自体公知のEIA、RIA、FIA或いはハイブリダイゼーション法等に於いて複合体分子(標識複合体分子)を形成させる際の反応条件に準じて行えばよい。

【0040】

本発明に於いて、対象分子Aと分子B(又は標識分子B)とを反応させて、複合体分子を形成する際の分子B(又は標識分子B)の使用濃度としては、対象分子Aの検量限界等により変動するため一概には言えないが、通常、反応液中に於いて、設定された検量限界濃度に相当する対象分子A全てと結合し得る濃度以上、好ましくはその2倍濃度以上、より好ましくは5倍濃度以上が反応液中に存在していることが望ましい。また、対象分子A、標識対象分子A及び分子Bを反応させて、標識複合体分子を形成させる際の標識対象分子Aの使用濃度及び分子Bの使用濃度は、対象分子Aの検量限界や測定感度等をどの程度に設定するかにより適宜設定すればよいが、標識分子Aの使用濃度は、少なくとも反応液中に存在する分子B全てと結合し得る濃度以上である。

【0041】

本発明の測定方法に於いて、反応時のpHや温度は、対象分子Aと分子Bの性質により異なるため一概には言えないが、複合体分子(又は標識複合体分子)が形成されるのを妨げない範囲であればよく、pHは、通常2~10、好ましくは5~9であり、温度は、通常0~90℃、好ましくは20~80℃である。また、反応時間は、複合体分子(又は標識複合体分子)が形成されるのに要する時間が、対象分子Aと分子Bの性質により異なるので、夫々の性質に応じ、通常数秒乃至数時間適宜反応させればよい。

【0042】

本発明の測定方法に於いて、分離された該複合体分子中の分子B(又は標識物質)、又は遊離の分子B(又は標識分子B中の標識物質)、或いは分離された該標識複合体分子中の標識物質又は遊離の標識対象分子A中の標識物質を測定する

には、分子B又は標識物質の種類に応じて夫々所定の方法に従って行えばよい。例えば、その性質が酵素活性の場合にはEIAやハイブリダイゼーション法等の常法、例えば「酵素免疫測定法、蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川榮治編集、51～63頁、共立出版（株）、1987年9月10日発行」等に記載された方法に準じて測定を行えばよく、検出物質が放射性物質の場合にはRIAやハイブリダイゼーション法等の常法に従い、該放射性物質の出す放射線の種類及び強さに応じて液浸型GMカウンター、液体シンチレーションカウンター、井戸型シンチレーションカウンター等の測定機器を適宜選択して使用し、測定を行えばよい（例えば医化学実験講座、第8巻、山村雄一監修、第1版、中山書店、1971、生化学実験講座2 トレーサー実験法下、竹村彰祐、本庶佑、501～525頁、（株）東京化学同人、1977年2月25日発行等参照。）。また、その性質が蛍光性の場合には蛍光光度計や共焦点レーザー顕微鏡等の測定機器を用いるFIAやハイブリダイゼーション法等の常法、例えば「図説 蛍光抗体、川生明著、第1版、（株）ソフトサイエンス社、1983」、「生化学実験講座2 核酸の化学III、実吉峯郎、299～318頁、（株）東京化学同人、1977年12月15日発行」等に記載された方法に準じて測定を行えばよく、その性質が発光性の場合にはフォトンカウンター等の測定機器を用いる常法、例えば「酵素免疫測定法、蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川榮治編集、252～263頁、共立出版（株）、1987年9月10日発行」等に記載された方法に準じて測定を行えばよい。更に、その性質が紫外部に吸収を有する性質の場合には分光光度計等の測定機器を用いる常法によって測定を行えばよく、その性質が発色性の場合には分光光度計や顕微鏡等の測定機器を用いる常法によって測定を行えばよい。また、検出物質がスピンの性質を有する物質の場合には電子スピン共鳴装置を用いる常法、例えば「酵素免疫測定法、蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川榮治編集、264～271頁、共立出版（株）、1987年9月10日発行」等に記載された方法に準じて夫々測定を行えばよい。

【0043】

また、本発明の測定方法に於いて、前述した如き本発明の分離方法により分離された各分子を測定するには、例えば、電極の特定部分（電界の強い領域又は／

及び電界の弱い領域)に於いて、複合体分子又は／及び遊離の分子Bが分離・捕集されているか否かを、該複合体分子中の分子B(又は標識物質)、又は遊離の分子B(又は標識分子B中の標識物質)を直接観察することにより測定してもよい。尚、この場合、分子B又は標識物質は、放射性、蛍光性、発光性、発色性、スピンの性質等を有するものが好ましい。

【0044】

また、例えば前述した如き電極基板からの流出液をそのまま検出部に導き、流出液中の複合体分子中の分子B(又は標識物質)、又は遊離の分子B(又は標識分子B中の標識物質)、或いは分離された該標識複合体分子中の標識物質又は遊離の標識対象分子A中の標識物質を直接測定しても、また、検出部を有する電極基板を用いて、同様に測定してもよい。尚、これらの方法によれば、測定がより迅速に行える点で有利である。

この場合に、分子B又は標識物質が有している、何らかの方法により測定(検出)し得る性質が、例えば酵素活性であれば、電極基板の電極の下流末端と検出部との間に、酵素活性測定用の試薬を添加し流出液と反応させる、反応部を設ける必要がある。該反応部に於いて用いられる酵素活性測定用の試薬は、常法、例えば「酵素免疫測定法、蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川 榮治編集、51~63頁、共立出版(株)、1987年9月10日発行」等に記載された方法に準じて調製したものを用いても、市販されている臨床検査用キットの試薬を適宜選択して利用してもよい。また、分子B又は標識物質の性質が酵素活性以外の場合に於いても、検出感度を増加させる目的等で所定の試薬を添加、反応させるために、電極基板の電極の下流末端と検出部との間に適当な反応部を設けることは任意である。

【0045】

尚、上記2つの測定方法の内、後述の方法、即ち、電極上で分離した後、夫々の分子を検出部分に導く方法に於いては、例えば溶出溶液の流速、溶出流路形状、検出部に移動中の各分子の溶出溶液への拡散等の影響により、分離効率が低下したり、一旦分離した各分子の検出感度が低下する等する可能性がある。そのため、単に特定の分子を検出するだけであれば、前述の方法、即ち、電極上で分離

した後に、直接電極上を観察して分離された各分子を観察するという方法の方が、上記した如き拡散等の影響により生じる諸問題を解決でき、しかも分離された各分子を検出部分に導く必要がないので分離から検出までの時間を短縮できる、等の点で有利である。また、この方法は、電極基板上で反応、分離、検出が行えるため、反応部分、分離部分、検出部分を一体化できるので基板の省スペース化にもつながり、更には、溶出用の溶液を送流させる必要がなくなるため検出装置自体の小型化も望める等の点でも有利である。

【 0 0 4 6 】

本発明の測定方法は、本発明の分離方法を利用する以外は、上記した如き自体公知の方法に準じて実施すればよく、使用される試薬類もこれら自体公知の方法に準じて適宜選択すればよい。

【 0 0 4 7 】

本発明の測定方法を、特定の遺伝子配列を検出するためのハイブリダイゼーション法に用いる場合を例に取り、以下により具体的に説明する。

即ち、先ず、検出したい遺伝子配列と相補的な配列を持ち、且つ標識物質で標識された適当な長さのヌクレオチドプローブと、変性 1 本鎖化された未知の遺伝子を、適当な緩衝液中で混合・反応させてアニーリングさせ、該ヌクレオチドプローブと変性 1 本鎖化未知遺伝子との複合体を形成させる。次いで、得られた反応液を、前述した如き誘電泳動力を利用した本発明の分離方法に供し、該複合体と遊離のヌクレオチドプローブとを分離する。分離後、該複合体中の標識物質を、上記した如き方法により測定すれば、該未知遺伝子がヌクレオチドプローブと相補的な配列を含むのか否か、即ち、ヌクレオチドプローブと相補的な配列の存在の有無を測定することができる。

【 0 0 4 8 】

上記した如き方法に於いて、ヌクレオチドプローブや緩衝液等は、自体公知の方法に準じて適宜選択すればよい。また、ヌクレオチドプローブの調製方法、変性 1 本鎖化遺伝子の調製方法及びアニーリング条件等は、自体公知の方法に準じて実施すればよい。

【 0 0 4 9 】

以下に実施例、参考例及び実験例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。

【0050】

【実施例】

参考例. 1 誘電泳動電極基板の作製

最小ギャップ $7\mu\text{m}$ 、電極ピッチ $20\mu\text{m}$ 、電極数2016（1008対）の多段電極列を設計し、それに基づいて、電極作製用のフォトマスクを作製した。

即ち、アルミ蒸着したガラス基板にレジストを塗布した基板に電子ビーム描画装置にて上記設計通りの電極パターンを描画した後、レジストを現像し、アルミをエッチングすることによってフォトマスクを作製した。

電極基板の作製は、図解フォトファブリケーション、橋本貴夫著、総合電子出版、（1985）に記載の方法に準じて以下の如く行った。

即ち、上記の如くして作製したフォトマスクと、レジストを塗布したアルミ蒸着ガラス基板を密着させたのち、水銀ランプで電極パターンを露光した。露光後の電極用ガラス基板はレジストの現像、アルミ面のエッチングに続き、アルミ面に残ったレジストを除去することによって電極基板を作製した。アルミ表面は電気化学的に活性であり、DNAの吸着等が生じやすいので、希釈したフォトレジストをスピンコートすることによって、厚さ5nmの有機薄膜コーティングを施した。

【0051】

図4に、作製した電極基板の模式図を、また、図5に電極の模式図を夫々示す。尚、図4に於いて1は電極を示す。

【0052】

実験例. 1 電極上に於ける分子の観察

（1）DNA分子の観察

ハンドブック・オブ・フルオレッセント・プローブス・アンド・リサーチ・ケミカルズ、リチャード P. ホーランド、シックス・エディション、モレキュラー・プローブ社、（1996）に記載の方法に準じて、蛍光試薬YO-PRO-1（モレキュラー・プローブ社製商品名）で標識した λ DNA（48.5kb、2本鎖DNA）0.001mgを

含有する超純水溶液 1 ml、及び常法により短鎖DNAとして合成時に末端を蛍光色素フルオロセインにより標識したオリゴヌクレオチド (22 base、1本鎖DNA：自製品) 0.002mgを含有する超純水溶液 1 mlを、夫々DNA試料として用いた。

参考例. 1 で作製した電極基板上で、DNA分子が誘電泳動されるか否かを調べるため、上記DNA試料 (標識 λ DNA又は標識オリゴヌクレオチド) を夫々当該電極基板上に10 μ l滴下し、電極に周波数 1 MHzの交流電圧を徐々に印加し、蛍光顕微鏡下でDNA試料の蛍光を観察した。

【0053】

その結果、電極と電極の最小ギャップ間の電界強度が500KV/cm付近から λ DNAが誘電泳動によって強電界部分に集まり始めるのが観察されたが、この電界強度では、オリゴヌクレオチドが誘電泳動によって強電界部分に集合する様子は観察されなかった。

【0054】

(2) タンパク分子の観察

ジャーナル・オブ・バイオケミストリー、H. マエダ、65、777、(1969) に記載の方法に準じて、蛍光試薬FITC (フルオレセインイソチオシアネート、和光純薬工業 (株) 製) で標識したIgM (分子量約900kDa) 0.1mg含有する超純水溶液、及びジャーナル・オブ・バイオケミストリー、H. マエダ、65、777、(1969) に記載の方法に準じて、蛍光試薬TRITC (テトラメチルローダミンイソチオシアネート、和光純薬工業 (株) 製) で標識したBSA (分子量約65kDa) 0.1mgを含有する超純水溶液を、夫々タンパク試料として用いた。

当該電極上で、タンパク分子が誘電泳動されるか否かを調べるため、上記タンパク試料 (標識IgM又は標識BSA) を夫々電極基板上に10 μ l滴下し、電極に周波数 1 MHzの交流電圧を徐々に印加し、蛍光顕微鏡下でタンパク試料の蛍光を観察した。

【0055】

その結果、電極と電極の最小ギャップ間の電界強度が1.0MV/cm付近からFITC標識IgMが電界の強い部分に集まり始めるのが観察されたが、この電界強度では、TRITC標識したBSAは誘電泳動によって強電界部分に集合する様子は殆ど観察され

なかった。

【0056】

参考例. 2 流路を有する電極基板の作製

不均一交流電界中に分子を移動させることによる分子の分離を行うため、参考例. 1 で作製した電極基板上にシリコンゴムを用いて流路を作製した。

電極上に分子が溶解した溶液を送流するためのシリコンゴム流路は、深さ25 μ m、幅400 μ mで、電極基板上の電極が配置されている領域を通るように設計した。

作製は、図解フォトファブ리케이션、橋本貴夫著、総合電子出版、1985に記載の方法に準じて行った。まず、ガラス板上に厚さ25 μ mのシート状ネガレジストを貼り付けた後、流路作製用に設計したフォトマスクを用いて露光した後、ネガレジストの現像を行った。このネガレジスト基板を鋳型として未硬化のシリコンゴムを流し込んだ後、硬化させることによって電極が配置されている部分に高さ25 μ mの凹面を持つシリコンゴムを作製した。

電極基板とシリコンゴム流路を、電極基板上の電極が配置されている領域にシリコンゴム凹面があうように2液硬化型シリコンゴムで接着し、流路上流部に、溶液注入用のシリンジを差し込み、該電極基板に、電極上を分子が溶解している溶液を送流させる装置を付加した。

【0057】

図6に、作製した流路を有する電極基板の模式図を、また、図7に、そのa-a'断片の模式図を夫々示す。尚、図6に於いて、1は電極を示し、矢印は2種以上の分子が溶解した溶液が移動する方向を示す。また、図7に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

1：流路

2：ガラス板

3：電極

【0058】

実験例. 2 流路を有する電極基板を用いた分子の分析

(試料)

実験例. 1 で用いた標識 λ DNA 溶液及び標識オリゴヌクレオチド溶液を分子試料とした。

(操作)

上記分子溶液を、参考例. 2 で作製した流路を有する電極基板に、マイクロシリンジポンプ ((株) アイシス製、KSD100) を用いてサンプル導入口から流速 $80 \mu\text{m}/\text{sec}$ で送流した。印加する電界は周波数 1 MHz で、電界強度 (= 印加電圧 : 最小ギャップ $7 \mu\text{m}$ で定義) は数百 $\text{k} \sim$ 数 MV/m を用いた。

当該電極基板上的のサンプル導入口から、上記分子試料 (標識 λ DNA $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 又は標識オリゴヌクレオチド $0.56 \text{ pg}/\text{ml}$) を夫々導入し、導入後 $30 \text{ 秒} \sim 80 \text{ 秒}$ まで所定の電界を印加して流路出口付近での蛍光量を測定した。

尚、測定は、共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス工業 (株) 製、LSM-GB200) を用いて流路出口付近での流路部分の蛍光画像を約 5 秒 毎に取り込み、全ピクセルの輝度値の総和により測定した (以下、単に蛍光量と呼ぶ。)。尚、当該測定では、完全な共焦点像を用いると、流路の深さ方向に蛍光強度の分布があった場合、正確な結果が得られないため、レーザー顕微鏡のフォトマル側のオリフィスを全開にし、深さ方向の蛍光も積分して観察できるようにした。

捕集率は、以下の式から算出した。

即ち、当該測定に於いて、蛍光標識された分子試料はシリンジポンプにより電極構造上を移動するので、電界を印加しない場合、電極出口で測定される蛍光量は入口での蛍光量に等しいが、電界を印加し、分子が誘電泳動力によって電極に引き付けられれば蛍光量は低下する。従って、この蛍光量の低下分を電極に捕集された分子の量とみなし、元の分子の総量を 100 とした時の電極部分に引き付けられた分子の量を示すものとした。

【0 0 5 9】

【式 1】

$$\text{捕集率}\% = \frac{(\text{電界印加していない時の蛍光量} - \text{電界印加した蛍光量})}{\text{電界印加していない時の蛍光量}} \times 100$$

【0 0 6 0】

(結果)

標識IDNA溶液を用いて、電界強度 $0.60\text{MV}/\text{m}$ 又は $1.04\text{MV}/\text{m}$ を印加した場合の流路出口での蛍光量の時間変化を図8に、また、標識オリゴヌクレオチド溶液を用いて、電界強度 $1.4\text{MV}/\text{m}$ を印加した場合の流路出口での蛍光量の時間変化を図9に夫々示す。尚、図8に於いて、 $-\bigcirc-$ は、電界強度 $0.60\text{MV}/\text{m}$ を印加した場合の結果を、また、 $-\bullet-$ は、電界強度 $1.04\text{MV}/\text{m}$ を印加した場合の結果を夫々示す。

【0061】

図8から明らかなように、標識IDNA溶液を用いて、電界強度 $1.04\text{MV}/\text{m}$ を印加した場合には、電界が十分に強く、全てのIDNAが電極に捕集されるため、流路出口での蛍光量は、ほぼ0にまで低下することが判る。尚、80秒後に一時的に蛍光量が増加するのは、電界を切ったために、それまで電極部分に蓄積されていたDNA分子が放出されるため、一時的に初期状態よりも大きな蛍光量を示すようになるからであり、捕集されていたDNAが流出し終わるともとの蛍光量に戻っている。また、標識IDNA溶液を用いて、電界強度 $0.60\text{MV}/\text{m}$ を印加した場合も、同様の傾向がみられるが、電界印加時（30秒～80秒の間）で蛍光量が0にはならないこと、換言すれば、電界強度が十分でないため、完全にDNAが捕集されていないことが判る。尚、実験例. 1では、電界強度 $0.5\text{MV}/\text{m}$ で λ DNAは強電界領域に強く捕集されていたが、本実験では流路内の流れによる抗力が加わるため電極上で同様の分子の捕集能を得ようとした場合、流れのないときよりもより強い電界強度が必要となることが判る。

また、図9から明らかなように、標識オリゴヌクレオチド溶液を用いて、電界強度 $1.4\text{MV}/\text{m}$ を印加した場合には、蛍光量の低下が全く見られないこと、即ち、当該電界強度では、当該オリゴヌクレオチドが全く捕集されないことが判る。

以上の結果から、 λ DNAとオリゴヌクレオチドとを分離できることが示唆された。

【0062】

実施例. 1 溶液中のDNA分子の分離

λ DNA（48.5kb、2本鎖DNA）及びオリゴヌクレオチド（22 base、1本鎖DNA）が溶解した溶液から、夫々の成分の分離を行った。

(試料)

蛍光試薬YO-PRO-1で標識した λ DNA (48.5kb、2本鎖DNA) 5 μ g/mlと、短鎖DNAとして合成時に末端を蛍光色素フルオロセインにより標識したオリゴヌクレオチド (22 base、1本鎖DNA) 2.3pg/mlとが、互いに等しい蛍光量を発することを、予め蛍光強度測定により確認したので、この結果に基づいて、表1に示すように、標識オリゴヌクレオチド及び標識 λ DNAを所定濃度含有する超純水溶液を夫々試料とした。

【0063】

【表1】

試料 番号	混合比 オリゴヌクレオチド： λ DNA	標識オリゴヌクレオチド濃度	標識 λ DNA 濃度
1	0:1	0 pg/ml	10 μ g/ml
2	1:1	2.3 pg/ml	5 μ g/ml
3	5:1	2.3 pg/ml	1 μ g/ml
4	1:0	2.3 pg/ml	0 μ g/ml

【0064】

(操作)

試料を、参考例、2で作製した流路を有する電極基板に、マイクロシリンジポンプ（（株）アイシス製、KSD100）を用いてサンプル導入口から流速800 μ m/secで送流した。印加する電界は周波数1 MHzで、電界強度0.86MV/m又は1.02MV/mを用い、試料導入後30秒～80秒まで所定の電界を印加して流路出口付近での標識 λ DNAの蛍光量を測定した。尚、測定及び捕集率は、実験例、2と同様に求めた。

(結果)

結果を図10に示す。尚、図10に於いて、 \circ は、標識オリゴヌクレオチドと λ DNAとの混合比が0:1の試料を用いた結果を、 \square は標識オリゴヌクレオチドと λ DNAとの混合比が1:1の試料を用いた結果を、 $+$ は、標識オリゴヌクレオチドと λ DNAとの混合比が5:1の試料を用いた結果を、また、 $-$

×-は、標識オリゴヌクレオチドとλ DNAとの混合比が 1 : 0 の試料を用いた結果を夫々示す。

【 0 0 6 5 】

本実施例に於いて、全てのλ-DNAが捕集され、オリゴヌクレオチドが全く捕集されない場合を考えると、捕集率は、試料全体の蛍光量に占めるλDNAに由来する蛍光量の割合に等しくなる。即ち、試料1（標識オリゴヌクレオチドとλ DNAとの混合比が 0 : 1 の試料）では捕集率が100%、試料2（標識オリゴヌクレオチドとλ DNAとの混合比が 1 : 1 の試料）では $1/(1+1)=50\%$ 、試料3（標識オリゴヌクレオチドとλ DNAとの混合比が 5 : 1 の試料）では $1/(1+5)=16.7\%$ 、試料4（標識オリゴヌクレオチドとλ DNAとの混合比が 1 : 0 の試料）では0となるはずである。

【 0 0 6 6 】

図 1 0 の結果から、電界強度 0.86MV/mを印加した場合、λDNAの捕集率（試料 1）は53%であり、オリゴヌクレオチド（試料 4）は全く捕集されないことが判る。また、試料 2（λDNA : オリゴヌクレオチド = 1 : 1 のサンプル）で約半分の20%強、試料 3（λDNA : オリゴヌクレオチド = 1 : 5 のサンプル）で10%弱の捕集率が得られており、試料 1 の捕集率53%から計算される理論値（試料 2 : $53\% \div 1/(1+1) = 26.5\%$ 、試料 3 : $53\% \div 1/(1+5) = 8.8\%$ ）とほぼ一致していることが判る。

また、電界強度1.02MV/mを印加した場合、λDNAのみ（試料 1）では100%の捕集率、オリゴヌクレオチドのみ（試料 4）ではほとんど捕集されないことが判る。また、試料 2 では捕集率が60%、試料 3 では約20%となり、上記の理論値50%、16.7%とほぼ一致していることが判る。このことから、本発明の方法により、λDNAとオリゴヌクレオチドとを、数十秒という短時間で分離し得ることが判る。

以上の結果から、分離したい分子と、共存する分子との組み合わせにより、適切な電界強度を選択することにより、2種以上の分子を分離することができるようになることが判る。

【 0 0 6 7 】

実施例. 2 溶液中のタンパク分子の分離

IgM（分子量約900kDa）及びBSA（分子量約65kDa）が溶解した溶液から、夫々

の成分の分離を行った。

(試料)

蛍光試薬FITCで標識したIgM (分子量約900kDa) 0.1mg/ml及び、蛍光試薬TRITCで標識したBSA (分子量約65kDa) 0.1mg/mlを含有する超純水溶液を試料とした。

(操作)

流速を400 μ m/sec、印加する電界強度を1.42MV/m、1.78MV/m又は2.14MV/mとした以外は、実施例 1と同様にして、標識IgM及び標識BSAの蛍光量を同時に測定し夫々の捕集率を求めた。

(結果)

結果を図 11に示す。尚、図 11に於いて、—○—は、標識IgMの捕集率を、また、—●—は、標識BSAの捕集率を夫々示す。

【0068】

図 11の結果から明らかなように、IgM、BSAともに電界強度を上昇させるにしたがって捕集率が上昇し、2.14MV/mの電界強度でIgMでは捕集率約68.5%、BSAでは捕集率38%となり、明らかにその分子量の違いによって捕集率に違いが見られることが判る。

尚、今回用いた電界強度では完全にタンパク分子を捕集することはできなかったが、タンパク分子の違いにより捕集率に有意差が見られたことから、分離電極部分をさらに延長することによって、IgMとBSAとの分離が可能になることが容易に予測できる。これによりタンパク分子レベルの大きさの違いによっても本発明の方法により分離が可能であることが示唆される。

【0069】

実施例 3 抗原抗体反応後のB/F分離

ビオチン標識した λ DNAとフルオレセイン標識した抗ビオチン抗体を混合して抗原抗体反応を行った溶液から、ビオチン標識 λ DNA—フルオレセイン標識抗ビオチン抗体複合体分子とビオチン標識 λ DNAに結合していない遊離のフルオレセイン標識抗ビオチン抗体の分離を行った。

(試料)

フォトビオチンラベリングキット（ニッポンジーン社製）を用い、添付の作製手順にしたがってビオチン標識 λ DNAを作製後、表2に示すような比率で各種成分を50mM PBS (pH7.5) 中で混合し、抗原抗体反応を行わせた。抗原抗体反応後、分子量5万の限外ろ過フィルターを用いて媒質を2.5mM 炭酸緩衝液 (pH10) に置換し、これを試料とした。

尚、21 μ g/mlのフルオレセイン標識抗ビオチン抗体（コスモバイオ（株））濃度は10 μ g/mlビオチン標識 λ DNA中のビオチンモル数と等しい量である。

【0070】

【表2】

試料番号	ビオチン標識 λ DNA 濃度	フルオレセイン標識抗ビオチン抗体濃度	未標識 λ DNA 濃度
1	0 μ g/ml	21 μ g/ml	10 μ g/ml
2	2.5 μ g/ml	21 μ g/ml	7.5 μ g/ml
3	5 μ g/ml	21 μ g/ml	5 μ g/ml
4	10 μ g/ml	21 μ g/ml	0 μ g/ml

【0071】

（操作）

電界強度を1.07MV/mとして実施例2と同様の操作を行い、複合体分子中のフルオレセイン標識抗ビオチン抗体及び遊離のフルオレセイン標識抗ビオチン抗体の蛍光量を測定し、複合体分子の捕集率を求めた。

（結果）

結果を図12に示す。図12の結果から明らかなように、複合体分子の捕集率が、ビオチン λ DNA濃度10 μ g/mlでは捕集率36%、5 μ g/mlでは捕集率25%、2.5 μ g/mlでは捕集率8.9%、0 μ g/mlでは捕集率6%となり、ビオチン標識 λ DNAの濃度低下とともにその捕集率も低下することが判る。また、 λ DNAを100%捕集するのに十分な誘電泳動条件において、試料1のビオチン標識されていない λ DNAを添加した場合の捕集率が6%であるのに対し、試料2、3、4のビオチン標識 λ DNAを添加したものでは有意にそれよりも高い捕集率を示したことから、フルオロ

セイン標識抗ビオチン抗体とビオチン標識λ DNAの抗原抗体反応による複合体分子と、ビオチン標識λ DNAに結合していない遊離のフルオレセイン標識抗ビオチン抗体の分離が、ある程度の濃度依存性を持って行えることが判る。

【 0 0 7 2 】

【発明の効果】

以上述べた如く、本発明は溶液中に溶解する 2 種以上の分子を、誘電泳動力を利用して相互に分離する方法を提供するものであり、本発明によれば、2 種以上の分子、例えば DNA やタンパク等の生体成分分子が溶解している溶液から、夫々の分子を迅速且つ容易に分離し得る。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

誘電泳動の原理を示す図である。

【図 2】

本発明に係る水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極の具体例を示す図である。

【図 3】

本発明に係る流路を有する電極基板の一例を示す図である。

【図 4】

参考例。1 で作製した誘電泳動電極基板の模式図である。

【図 5】

参考例。1 で作製した電極の模式図である。

【図 6】

参考例。2 で作製した流路を有する電極基板の模式図である。

【図 7】

参考例。2 で作製した流路を有する電極基板に於ける a - a' 断片の模式図である。

【図 8】

実験例。2 で得られた、標識λ DNA 溶液を用いて、電界強度 0.60MV/㎠又は 1.04MV/㎠を印加した場合の流路出口での蛍光量の時間変化を示す図である。

【図 9】

実験例. 2 で得られた、標識オリゴヌクレオチド溶液を用いて、電界強度 $1.4 \text{ MV}/\text{cm}$ を印加した場合の流路出口での蛍光量の時間変化を示す図である。

【図 1 0】

実施例. 1 で得られた、標識オリゴヌクレオチド及び標識 λ DNA が溶解した溶液を用いた場合の、電界強度と標識 λ DNA の捕集率との関係を示す図である。

【図 1 1】

実施例. 2 で得られた、標識 IgM 及び標識 BSA が溶解した溶液を用いた場合の、電界強度と標識 IgM 又は標識 BSA の捕集率との関係を示す図である。

【図 1 2】

実施例. 3 で得られた、ビオチン標識 λ DNA 及びフルオレセイン標識抗ビオチン抗体の抗原抗体反応後の、ビオチン標識 λ DNA 濃度と、ビオチン標識 λ DNA - フルオレセイン標識抗ビオチン抗体複合体分子の捕集率との関係を示す図である。

【符号の説明】

図 3 に於いて、矢印は 2 種以上の分子が溶解した溶液が移動する方向を示す。

図 4 に於いて、1 は電極を示す。

図 6 に於いて、1 は電極を示し、矢印は 2 種以上の分子が溶解した溶液が移動する方向を示す。

図 7 に於いて、各数字は夫々以下のものを示す。

1 : 流路

2 : ガラス板

3 : 電極

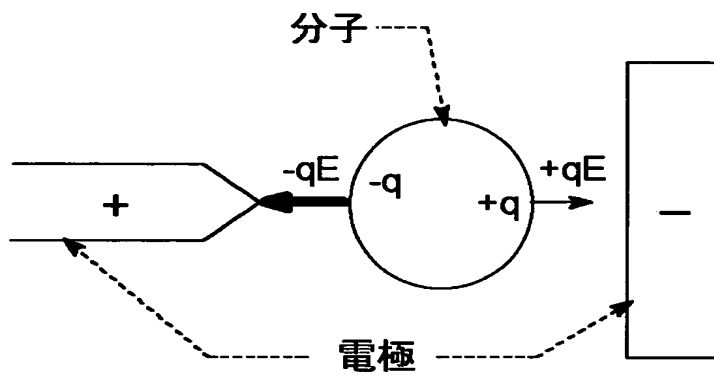
図 8 に於いて、 \circ は、電界強度 $0.60 \text{ MV}/\text{cm}$ を印加した場合の結果を、また、 \bullet は、電界強度 $1.04 \text{ MV}/\text{cm}$ を印加した場合の結果を夫々示す。

図 1 0 に於いて、 \circ は、標識オリゴヌクレオチドと λ DNA との混合比が 0 : 1 の試料を用いた結果を、 \square は標識オリゴヌクレオチドと λ DNA との混合比が 1 : 1 の試料を用いた結果を、 $+$ は、標識オリゴヌクレオチドと λ DNA との混合比が 5 : 1 の試料を用いた結果を、また、 \times は、標識オリゴヌクレオチドと λ DNA との混合比が 1 : 0 の試料を用いた結果を夫々示す。

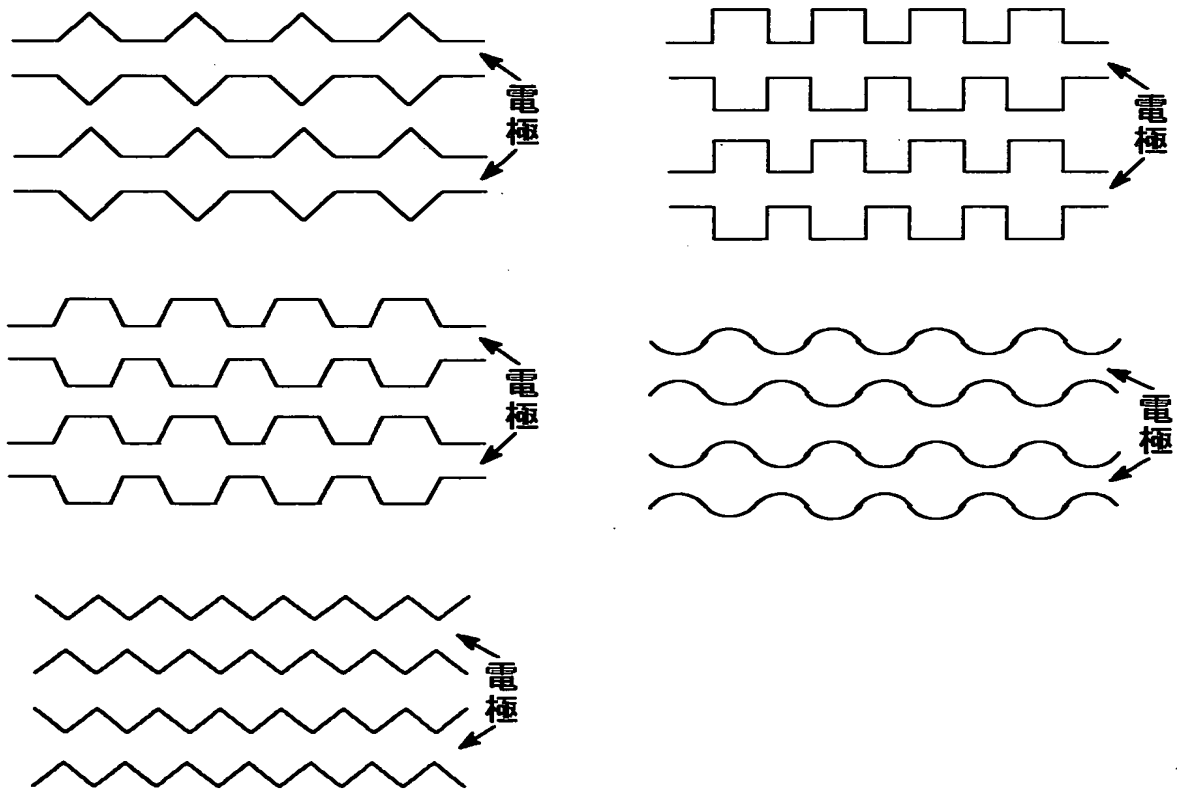
図 1 1 に於いて、-○-は、標識IgMの捕集率を、また、-●-は、標識BSAの捕集率を夫々示す。

【書類名】 図面

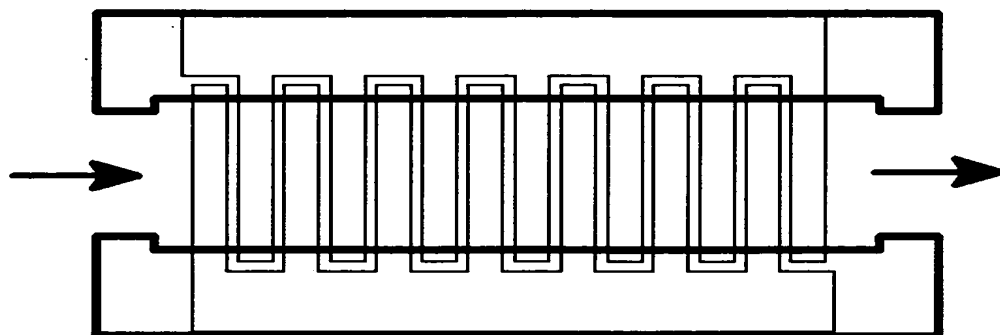
【図 1】



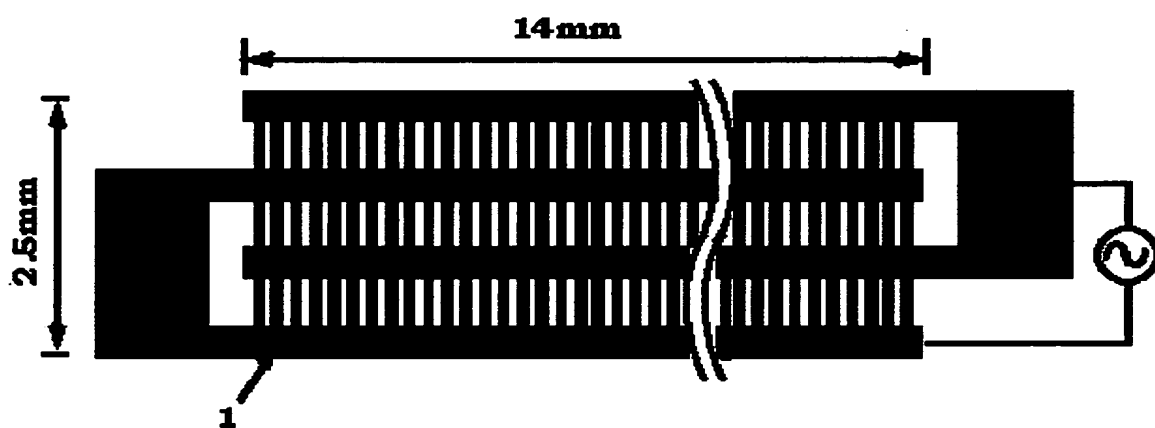
【図 2】



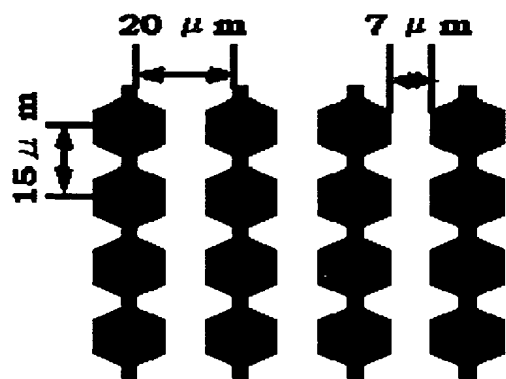
【图 3】



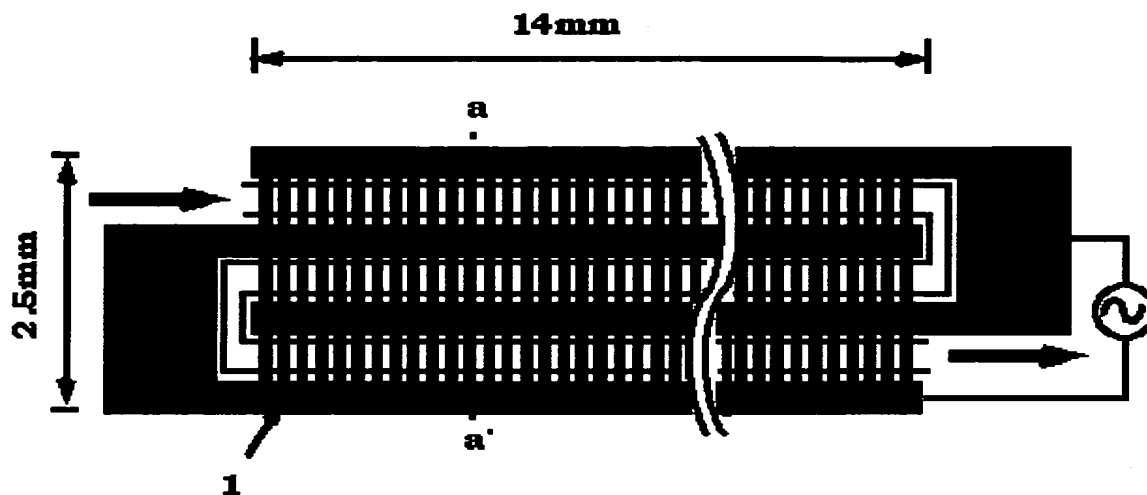
【图 4】



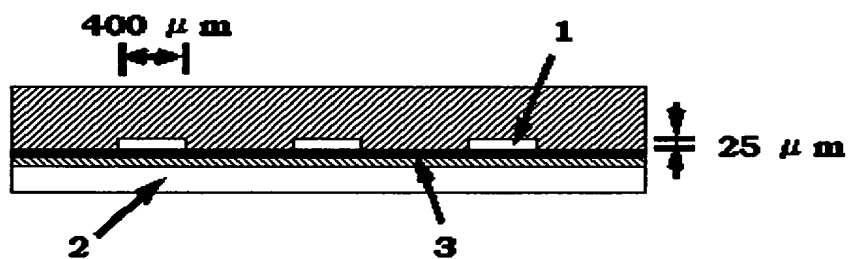
【图 5】



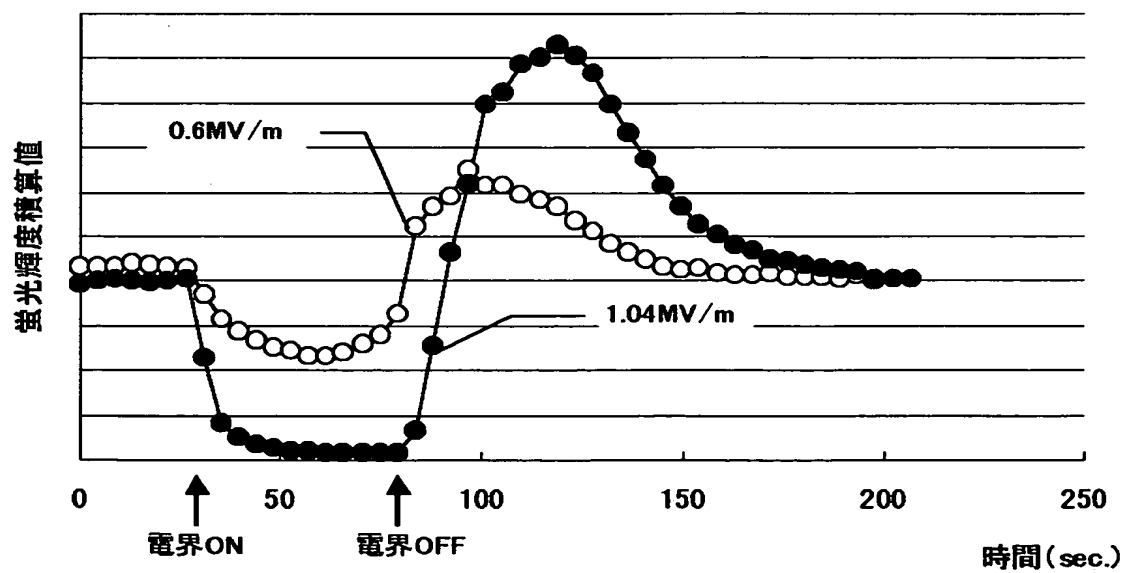
【図 6】



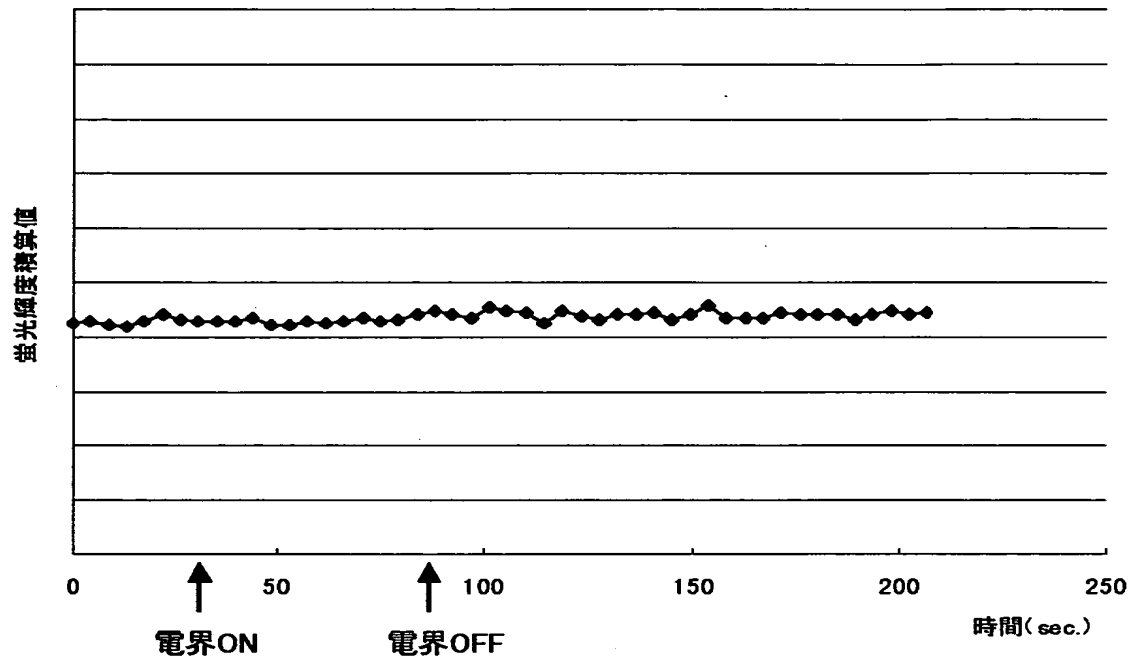
【図 7】



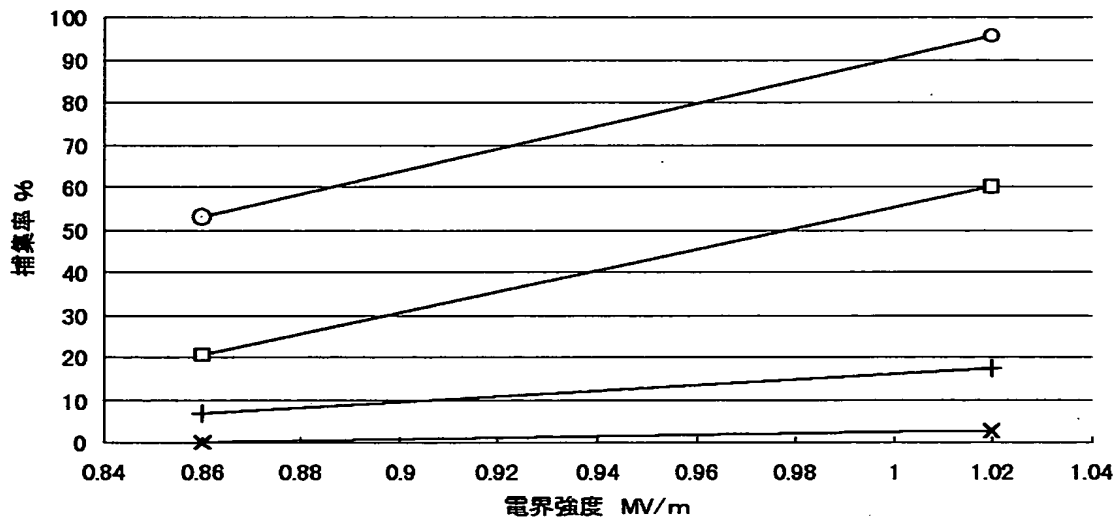
【図 8】



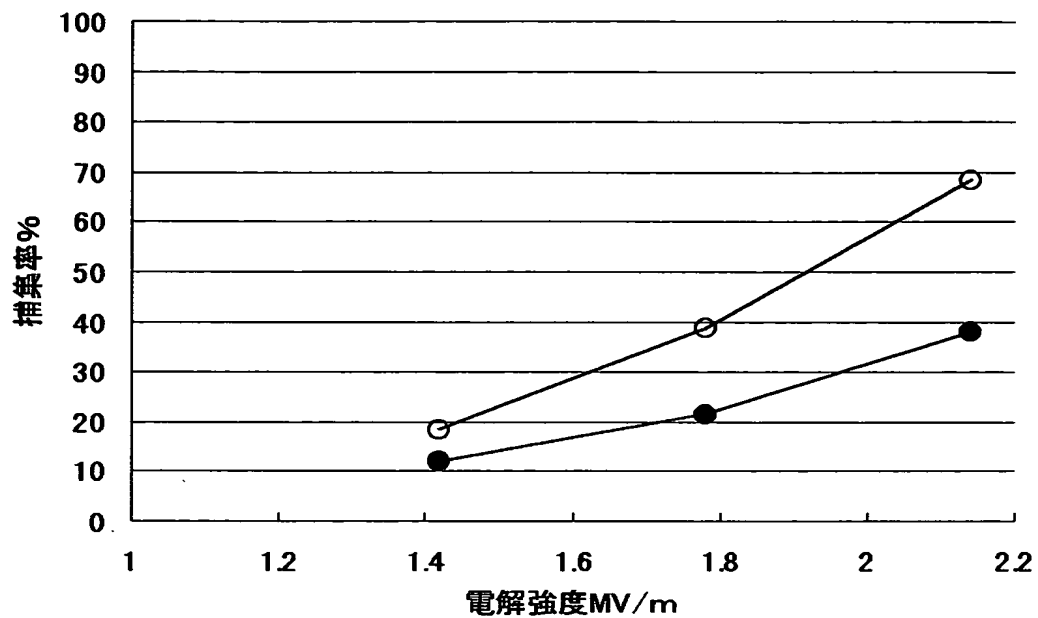
【図 9】



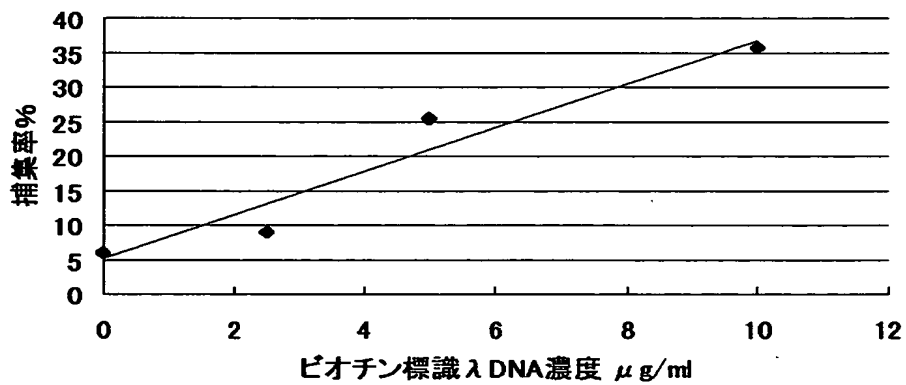
【図 10】



【図 1 1】



【図 1 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 2 種以上の分子、特に、例えばDNAやタンパク等の生体成分分子が溶解している溶液から、夫々の分子を迅速且つ容易に分離する方法及び該分離方法を用いて分離された分子を測定する方法の提供。

【解決手段】 測定対象分子（対象分子A）を含む試料と、該対象分子Aに特異的に結合し且つ標識物質により標識されていてもよい分子（分子B）とを反応させて得られる、対象分子Aと分子Bとの複合体分子及び遊離の分子Bとが溶解している溶液を、水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極に形成させた、電界強度500KV/㎢以上の不均一交流電界内に存在せしめ、当該複合体分子と遊離の分子Bとを分離した後、該複合体分子中の分子B若しくは該複合体分子中の分子Bに結合した標識物質又は遊離の分子B若しくは遊離の分子Bに結合した標識物質に基づいて対象分子Aを測定することを特徴とする、試料中の対象分子Aの測定法。

【選択図】 なし。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000252300]

1. 変更年月日	1990年 8月 7日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
氏 名	和光純薬工業株式会社